



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

⑧⑦ **EP 0 502 812 B1**

⑩ **DE 692 12 671 T 2**

⑤① Int. Cl.®:
C 12 N 15/62
C 12 N 1/21
G 01 N 33/574
A 61 K 39/395
C 07 K 16/30

DE 692 12 671 T 2

②① Deutsches Aktenzeichen: 692 12 671.6
⑧⑥ Europäisches Aktenzeichen: 92 810 056.9
⑧⑥ Europäischer Anmeldetag: 27. 1. 92
⑧⑦ Erstveröffentlichung durch das EPA: 9. 9. 92
⑧⑦ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 14. 8. 96
④⑦ Veröffentlichungstag im Patentblatt: 13. 3. 97

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①
05.02.91 EP 91810079

⑦③ Patentinhaber:
Ciba-Geigy AG, Basel, CH

⑦④ Vertreter:
Zumstein & Klingseisen, 80331 München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL,
PT, SE

⑦② Erfinder:

Wels, Winfried Stephan, Dr., CH-4058 Basle, CH;
Hynes, Nancy E., Dr., CH-4059 Basle, CH; Harwerth,
Ina-Maria, W-7889 Grenzach-Wyhlen, DE; Groner,
Bernd, Dr., CH-4059 Basle, CH; Hardman, Norman,
Dr., CH-4125 Riehen, CH; Zwickl, Markus, CH-4057
Basle, CH

⑤④ Rekombinante Antikörper spezifisch für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 692 12 671 T 2

Patentansprüche für alle benannten Vertragsstaaten
AT, BE, CH/LI, DE, DK, FR, GB, GR, IT, LU, NL, PT, SE

1. Fusionsprotein, das einen rekombinanten Einketten-Antikörper umfaßt, der gegen die extrazelluläre Domäne des Wachstumsfaktor-Rezeptors c-erbB-2 gerichtet ist, welcher eine variable Domäne einer schweren Kette und eine variable Domäne einer leichten Kette eines monoklonalen Antikörpers, wobei die Domänen durch eine Polypeptid-Spacergruppe verbunden sind, und ein Effektormolekül umfaßt, und gegebenenfalls ein Peptid, das die Reinigung erleichtert, eine Spaltstelle und einen Peptid-spacer umfaßt.

2. Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die variable Domäne der schweren Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 2-120 der SEQ ID Nr.4 umfaßt, worin gegebenenfalls 1, 2, 3 oder 4 einzelne Aminosäuren in den Aminosäuresequenzen 2-31 (FR₁), 37-50 (FR₂), 68-99 (FR₃) und/oder 110-120 (FR₄), durch andere Aminosäuren ersetzt sind oder entfernt wurden, und worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.

3. Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die variable Domäne der schweren Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 2-120 der SEQ ID Nr.4 umfaßt, worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.

4. Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die variable Domäne der leichten Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 136-241 der SEQ ID Nr.4 umfaßt, worin gegebenenfalls 1, 2, 3 oder 4 einzelne Aminosäuren in den Aminosäuresequenzen 136-158 (FR₆), 170-184 (FR₇), 192-223 (FR₈), und/oder 233-241 (FR₉) durch andere Aminosäuren ersetzt sind, oder entfernt wurden, und worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.

5. Fusionsprotein nach Anspruch 4, worin die variable Domäne der leichten Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 136-241 der SEQ ID Nr.4 umfaßt, worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.
6. Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die variable Domäne der schweren Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 2-121 der SEQ ID Nr.8 umfaßt, worin gegebenenfalls 1, 2, 3 oder 4 einzelne Aminosäuren in den Aminosäuresequenzen 2-31 (FR₁), 37-50 (FR₂), 68-99 (FR₃) und/oder 111-121 (FR₄) durch andere Aminosäuren ersetzt sind oder entfernt wurden, und worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.
7. Fusionsprotein nach Anspruch 6, worin die variable Domäne der schweren Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 2-121 der SEQ ID Nr.8 umfaßt, worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.
8. Fusionsprotein nach Anspruch 6, worin die variable Domäne der leichten Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 137-241 der SEQ ID Nr.8 umfaßt, worin gegebenenfalls eine oder mehrere einzelne Aminosäuren in den Aminosäuresequenzen 137-159 (FR₆), 171-185 (FR₇), 193-224 (FR₈) und/oder 233-241 (FR₉) durch andere Aminosäure ersetzt sind oder entfernt wurden, und worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.
9. Fusionsprotein nach Anspruch 8, worin die variable Domäne der leichten Kette ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 137-241 der SEQ ID Nr.8 umfaßt, worin die Aminosäure Cys in dem oxidierten Zustand unter Bildung von S-S-Brücken vorliegen kann.
10. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin das Effektormolekül ein Enzym oder eine biologisch aktive Variante davon ist.

11. Fusionsprotein nach Anspruch 10, worin das Enzym alkalische Phosphatase oder eine biologisch aktive Variante davon ist.

12. Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin das Effektormolekül ein Toxin oder eine biologisch aktive Variante davon ist.

13. Fusionsprotein nach Anspruch 12, worin das Effektormolekül Pseudomonas Exotoxin oder eine biologisch aktive Variante davon ist.

14. Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die variable Domäne der schweren Kette und die variable Domäne der leichten Kette von einem monoklonalen Maus-Antikörper abgeleitet ist, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus FRP5, FSP16, FWP51 und FSP77, die gemäß dem Budapester Vertrag am 21. November 1990 bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) in Porton Down, Salisbury, GB, unter den Hinterlegungsnummern 90112115, 90112116, 90112117 bzw. 90112118 hinterlegt wurden.

15. Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die variable Domäne der schweren Kette und die variable Domäne der leichten Kette von dem monoklonalen Maus-Antikörper FRP5 abgeleitet sind.

16. Fusionsprotein nach Anspruch 1, worin die variable Domäne der schweren Kette und die variable Domäne der leichten Kette von dem monoklonalen Maus-Antikörper FWP51 abgeleitet sind.

17. Fusionsprotein, das als Fv(FRP5)-phoA bezeichnet wird, nach Anspruch 1, welches ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 2-690 der SEQ ID Nr.5 umfaßt.

18. Fusionsprotein, das als Fv(FRP5)-ETA bezeichnet wird, nach Anspruch 1, welches ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 2-606 der SEQ ID Nr.10 umfaßt.

19. Fusionsprotein, das als Fv(FWP51)-ETA bezeichnet wird, nach Anspruch 1, welches ein Polypeptid der Aminosäuresequenz 2-606 der SEQ ID Nr.11 umfaßt.

20. Rekombinante DNA, welche ein Insert umfaßt, das ein Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 19 codiert.

21. Rekombinante DNA nach Anspruch 20, die ein Insert umfaßt, das eine variable Domäne einer schweren Kette der Maus eines monoklonalen Antikörpers codiert, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Antikörpern FRP5, FSP16, FSP77 und FWP51, die gemäß dem Budapester Vertrag am 21. November 1990 bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) in Porton Down, Salisbury, GB, unter den Hinterlegungsnummern 90112115, 90112116, 90112117 bzw. 90112118 hinterlegt wurden, oder eine Aminosäuresequenz codiert, die zu der variablen Domäne der schweren Kette homolog ist.

22. Rekombinante DNA nach Anspruch 21, die ein Insert umfaßt, das eine variable Domäne einer leichten Kette der Maus eines monoklonalen Antikörpers codiert, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Antikörpern FRP5, FSP16, FSP77 und FWP51, die gemäß dem Budapester Vertrag am 21. November 1990 bei der European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) in Porton Down, Salisbury, GB, unter den Hinterlegungsnummern 90112115, 90112116, 90112117 bzw. 90112118 hinterlegt wurden, oder eine Aminosäuresequenz codiert, die zu der variablen Domäne der leichten Kette homolog ist.

23. Rekombinante DNA nach Anspruch 20, die ein Hybridvektor ist, der weiter einen Ursprung der Replikation oder eine autonom replizierende Sequenz, einen oder mehrere dominante Markersequenzen, und gegebenenfalls Expressionskontrollsequenzen, Signalsequenzen und zusätzliche Restriktionschnittstellen enthält.

24. Hybridvektor nach Anspruch 23, der einen Affen-Virus-Promotor und den Enhancer der Maus Ig H- oder L-Kette umfaßt.

25. Verfahren zur Herstellung einer DNA nach Anspruch 20, welches die folgenden Schritte umfaßt:

a) Herstellen von Maus-DNA aus dem Genom einer geeigneten Hybridomzelllinie und Auswählen der gewünschten DNA, die die variablen Domänen der schweren und/oder leichten Kette des Antikörpers mit der gewünschten Spezifität codiert,

b) Herstellen von DNA, die die gewünschte Signalsequenz codiert und Herstellen von DNA, die ein Effektormolekül codiert,

c) Synthetisieren von DNA mittels chemischer Methoden, die die gewünschte Spacergruppe codiert,

d) Bilden rekombinanter Gene, die die Fusionsproteine codieren, indem die DNA aus Schritt a) und c) und gegebenenfalls b) in geeignete Hybridvektoren eingebaut werden,

e) Transferieren der erhaltenen Hybridvektoren in eine aufnehmende Wirtszelle oder Wiedergewinnen der DNA, die die rekombinanten Gene codiert und Transferieren der nicht-verknüpften DNA in eine aufnehmende Wirtszelle,

f) Auswählen und Züchten der transformierten Wirtszelle, und

g) gegebenenfalls Isolieren der gewünschten DNA.

26. Wirtszelle, die mit einer rekombinanten DNA nach Anspruch 25 transformiert ist.

27. Wirtszelle nach Anspruch 26, die eine Zelle eines E.coli-Stamms ist.

28. Verfahren zur Herstellung einer transformierten Wirtszelle nach Anspruch 26, wobei geeignete aufnehmende Zellen mit einem Hybridvektor transformiert werden, der ein DNA-Insert nach Anspruch 20, einen Ursprung der Replikation oder eine autonom replizierende Sequenz, einen oder mehrere dominante Markersequenzen und gegebenenfalls Expressionskontrollsequenzen, Signalsequenzen und zusätzlich Restriktionsschnittstellen umfaßt, und die transformierten Zellen ausgewählt werden.

29. Verwendung eines Fusionsproteins nach Anspruch 1 zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des Wachstumsfaktor-Rezeptors c-erbB-2.

30. Verwendung nach Anspruch 29, welches Immunfärben von Gewebeschnitten mit einer Lösung umfaßt, die das Fusionsprotein, welches ein nachweisbares Enzym umfaßt, enthält.

31. Test-Kit zur qualitativen und quantitativen Bestimmung des c-erbB-2-Proteins, welcher ein Fusionsprotein nach Anspruch 1 umfaßt.

32. Fusionsprotein nach Anspruch 1 zur Verwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

33. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren, die den Wachstumsfaktor-Rezeptor c-erbB-2 überexprimieren, welche eine therapeutisch wirksame Menge eines Fusionsproteins nach Anspruch 1 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.

34. Verwendung eines Fusionsproteins nach Anspruch 1 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung.